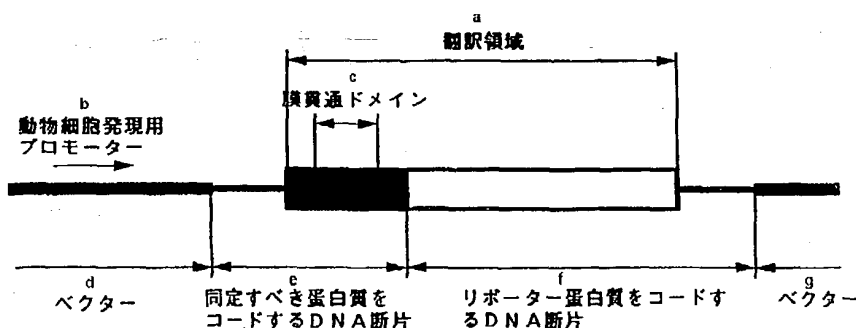


<p>(51) 国際特許分類6 C12Q 1/68, C12N 15/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/39476</p> <p>(43) 国際公開日 1998年9月11日(11.09.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/00830</p> <p>(22) 国際出願日 1998年2月27日(27.02.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/47775 1997年3月3日(03.03.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 財団法人 相模中央化学研究所 (SAGAMI CHEMICAL RESEARCH CENTER)[JP/JP] 〒229-0012 神奈川県相模原市西大沼4丁目4番1号 Kanagawa, (JP) 株式会社 プロテジーン(PROTEGENE INC.)[JP/JP] 〒153-0065 東京都目黒区中町2丁目20番3号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 加藤誠志(KATO, Seishi)[JP/JP] 〒229-0014 神奈川県相模原市若松3-46-50 Kanagawa, (JP) 小林みどり(KOBAYASHI, Midori)[JP/JP] 〒252-0801 神奈川県藤沢市長後647-2 Kanagawa, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	

(54)Title: METHOD OF IDENTIFYING GENE ENCODING TYPE II MEMBRANE PROTEIN

(54)発明の名称 II型膜蛋白質をコードする遺伝子の同定方法



a ... Translated region

b ... Promoter for expression in animal cell

c ... Transmembrane domain

d ... Vector

a ... DNA fragment encoding the protein to be identified

f ... DNA fragment encoding reporter protein

g ... Vector

(57) Abstract

A method of identifying a gene encoding a type II membrane protein which comprises transferring a fused gene of a DNA fragment encoding the protein to be identified with a gene encoding a reporter protein into an animal cell, expressing the fused gene therein, and identifying the gene encoding the type II membrane protein with the use of the expression of the reporter protein on the membrane surface as an index.

(57) 要約

本発明は、Ⅱ型膜蛋白質をコードする遺伝子を同定する方法を提供する。

本発明の方法は、同定すべき蛋白質をコードするDNA断片とリポーター蛋白質をコードする遺伝子の融合遺伝子を動物細胞に導入して該融合蛋白質を発現させ、リポーター蛋白質が膜表面に発現することを指標にしてⅡ型膜蛋白質をコードする遺伝子を同定する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AT	オーストリア	GB	ガボン	LV	ラトヴィア	TD	チャード
AU	オーストラリア	GE	英国	MC	モナコ	TG	トーゴ
AZ	アゼルバイジャン	GR	ギリシア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BB	バルバドス	GM	ガンビア	MK	マケドニア旧ユーゴス	TR	トルコ
BE	ベルギー	GN	ギニア		ラヴィア共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BG	ブルキナ・ファソ	GW	ギニア・ビサウ	ML	マリ	UA	ウクライナ
BJ	ブルガリア	GR	ギリシャ	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	US	米国
BY	ベラルーシ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CA	カナダ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	VN	ウイエトナム
CC	中央アフリカ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CF	コンゴ共和国	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CG	コンゴ	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CH	スイス	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CI	コートジボワール	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CM	カメルーン	KG	キルギス	PT	ポルトガル		
CN	中国	KR	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CU	キューバ	KZ	韓国	RU	ロシア		
CY	キプロス	LA	ラオス	SD	スーダン		
CZ	チェコ	LC	セント・ルシア	SE	スウェーデン		
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
DK	デンマーク	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア		
EE	エストニア	LR	リベリア	SK	スロヴァキア		
ES	スペイン						

明 細 書

Ⅱ型膜蛋白質をコードする遺伝子の同定方法

5 技術分野

本発明は、Ⅱ型膜蛋白質をコードする遺伝子を同定する方法に関する。この方法により、医薬として有用なⅡ型膜蛋白質をコードする遺伝子を容易に同定することが出来る。

10 背景技術

Ⅱ型膜蛋白質は、シグナルレセプター、イオンチャンネル、トランスポーターなどとして、細胞膜を介する物質輸送や情報伝達において重要な役割を担っている。これらの膜蛋白質は、ある特定の細胞や癌細胞に特異的に発現していることが多く、これに対する抗体を作製すれば、各種診断やドラッグデリバリー用キャリアーとして利用できる。また、これらの膜蛋白質遺伝子を導入して膜蛋白質を発現させた細胞は、対応するリガンドの検出などに応用できる。

現在ゲノムプロジェクトの進展に伴い、数多くの新規cDNAがクローン化されている。これらのcDNAクローンの中から、Ⅱ型膜蛋白質をコードするcDNAクローンを選択できれば、産業上利用可能なⅡ型膜蛋白質を効率良く得ることができる。

Ⅱ型膜蛋白質の特徴は、N末端に存在する疎水性の高い領域が膜を貫通し、N末端側が細胞質側、C末端側が細胞外に位置することである。したがって、cDNAがコードする蛋白質のN末端に疎水性領域があり、かつ、この領域が膜の中に留まれば、このcDNAはⅡ型膜蛋白質をコードしているといえる。N末端の疎水性領域が分泌シグナル配列である場合には、シグナルペプチダーゼによって膜表面で切断され、

C末端側は膜に留まることなく、細胞外に遊離される。このような分泌シグナルを同定する方法は、すでにいくつか知られているが[Tashiro et al., Science 261:600-603 (1993); Yokoyama-Kobayashi et al., Gene 163:193-196 (1994)], II型膜蛋白質の膜貫通ドメインを同定する方法は、まだ知られていない。

発明の開示

本発明者らは、鋭意研究の結果、II型膜蛋白質の膜貫通ドメインをコードするDNA断片を、リポーター蛋白質の遺伝子と融合させたのち、動物細胞に導入すると、リポーター蛋白質が膜表面に留まることを見だし、これを利用することによって、II型膜蛋白質の膜貫通ドメインをコードする遺伝子を同定する方法を構築し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、同定すべき蛋白質をコードするDNA断片とリポーター蛋白質をコードする遺伝子の融合遺伝子を動物細胞に導入して融合蛋白質を発現させ、リポーター蛋白質が該細胞の膜表面に発現することを指標とする、II型膜蛋白質をコードする遺伝子の同定方法を提供する。

図面の簡単な説明

図1は、融合遺伝子の構造を示す。

図2は、HP10085がコードしている蛋白質についてKyte-Doolittleの方法で求めた疎水性／親水性プロフィールを示す。

図3は、プラスミドベクターpSSD1-HP10085の構造を示す。

図4は、フィブリンプレートアッセイの結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明の方法において、リポーター蛋白質としては、N末端に膜貫

通ドメインを付加してやれば細胞表面に輸送され、かつ輸送されて細胞表面に留まったりリポーター蛋白質の検出が容易なものが望ましい。その例示として、プラスミノーゲンアクチベーター、たとえばウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベーター、組織プラスミノーゲンアクチベーター、あるいは血液凝固因子などの酵素類があげられる。リポーター蛋白質が本来分泌蛋白質である場合には、これらの蛋白質由来のシグナル配列ペプチドを除去したものを用いる。

- 本発明は、次の3つの工程からなる。
- 10 工程1 同定すべきDNA断片とリポーター蛋白質をコードする遺伝子との融合遺伝子を、動物細胞用発現ベクターに組換える。
- 工程2 得られたベクターをトランスフェクション法を用いて動物細胞に導入する。
- 工程3 ベクターを導入した細胞を培養後、培養上澄中ならびに細胞
- 15 膜表面上のリポーター蛋白質の有無を調べる。

各工程について以下詳細に説明する。

工程1

- 任意の同定すべきDNA断片とリポーター蛋白質をコードする遺伝子との融合遺伝子を、動物細胞用発現ベクターに組換えるには、次の2つの方法がある。
- 20

- <方法1> 動物細胞用プロモーター、クローニング部位(制限酵素切断部位)、リポーター蛋白質をコードする遺伝子が直列に接続されたベクターを用い、この中のクローニング部位にcDNA断片を挿入する。
- 25

<方法 2> 動物細胞用プロモーターの下流に完全長cDNAを含むベクターを、cDNA中に存在する制限酵素部位で切断し、この部位にリポーター蛋白質をコードする遺伝子を挿入する。

- 5 方法 1 を用いる場合、プラスミドベクターとしては、pSSD1[Yokoyama-Kobayashi et al., Gene 163:193-196 (1994)]などが例示できる。スクリーニングの対象となるDNA断片は、ゲノム由来、cDNA由来、合成DNAいずれでもかまわない。ゲノムやcDNAの場合、適当な制限酵素による切断片を用いても良いし、適当なプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法により調製したDNA断片を用いてもよい。もし、DNA断片中に開始コドンから始まるオープンリーディングフレームが存在し、リポーター蛋白質をコードする遺伝子のフレームが合っていると、これらの融合蛋白質を発現できるベクターが出来上がる(図 1)。
- 10
- 15 方法 2 を用いる場合、cDNAの供給源としては、動物細胞のプロモーターを含むベクターにクローン化されたcDNA発現ライブラリーを用いることができる。たとえば、pKA1(特開平4-117292に記載)、pcDV [Okayama and Berg, Mol. Cell. Biol. 3:280-289 (1983)]、pCDM8[Seed, Nature 329:840-842 (1987)]をベクターとして作製されたcDNAライブラリーを用いることができる。pKA1で作製したcDNAライブラリーを用いる場合、ベクターの中に存在しない一種類以上の制限酵素部位で切断後、平滑末端化し、次いでNot Iで切断後、リポーター蛋白質をコードするDNA断片を挿入すれば良い。
- 20

25 工程 2

工程 1 で、様々なDNA断片が挿入されたベクターの混合物が得られる。これで大腸菌を形質転換したのち、単一コロニー化し、各々から調製

したプラスミド、一本鎖DNA、あるいは一本鎖ファージを用いて、動物細胞のトランスフェクションを行なう。

5 発現ベクターを動物細胞に導入するには、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、リポソーム法、エレクトロポレーション法等を用いることが出来る(例えば実験医学別冊「遺伝子工学ハンドブック」、羊土社、1991、参照)。あるいは、一本鎖ファージを調製した後、これを用いてトランスフェクションを行なえば、より容易に遺伝子を動物細胞に導入することができる[Yokoyama-Kobayashi and Kato, Biochem. Biophys. Res. Commun. 192:935-939 (1993)]。

10 動物細胞としては、ベクターに組み込まれた複製オリジンやプロモーターが働くものであれば何でもかまわない。実施例のようにSV40の複製オリジンやプロモーターを使用する場合には、T抗原を発現しているCOS細胞が適している。

15 工程 3

発現ベクターを導入した動物細胞を適当な条件下で培養した後、培養上澄を調製する。この中にリポーター蛋白質が膜表面に留まっているかどうかは、用いたリポーター蛋白質の検出法を用いて調べる。酵素の場合には、対応する酵素活性検出法を用いる。

20 ウロキナーゼをリポーター蛋白とした場合には、人工基質ペプチドを用いる方法やフィブリンプレート法により検出できる。実施例では、フィブリンを含む寒天シートを、動物細胞の上に直接接触させることによって、細胞表面上に存在するウロキナーゼの活性を測定する方法を例示した。

25

次に実施例により発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。DNAの組換えに関する基本的な操作お

よび酵素反応は、文献('Molecular Cloning. A Laboratory Manual'、Cold Spring Harbor Laboratory、1989)に従った。制限酵素および各種修飾酵素は特に記載の無い場合宝酒造社製のものをを用いた。各酵素反応の緩衝液組成、並びに反応条件は付属の説明書に従った。

5

実施例

II型膜蛋白質をコードするcDNAのクローニング

ヒトリンホーマ細胞株U937cDNAライブラリー[Kato et al., Gene 150:243-250 (1994)]から得られたクローンHP10085のcDNAインサートの全塩基配列を決定したところ、150bpの5' 非翻訳領域、450bpのORF、97bpの3' 非翻訳領域からなる構造を有していた(配列表1)。ORFは149アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしており、N末端に1箇所の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域が存在した。図2にKyte-Doolittleの方法で求めた本蛋白質の疎水性/親水性プロファイルを示す。本蛋白質のアミノ酸配列を用いてプロテインデータベースを検索したところ、II型膜蛋白質の一つであるヒト初期活性化抗原CD69(SWISS-PROTアクセション番号Q07108)と類似性を有していた。表1に、本発明のヒト蛋白質(HP)とヒト初期活性化抗原CD69(CD)のアミノ酸配列の比較を示す。-はギャップを、*は本発明の蛋白質と同一アミノ酸残基を、. は本発明の蛋白質と類似アミノ酸残基をそれぞれ表す。両者は、C末端112アミノ酸残基の領域で36.6%の相同性を有していた。

25

ターフラグメント約10ngを混和し、宝酒造製DNAライゲーションキットを用いて連結させた。この反応物を用いて大腸菌JM109の形質転換を行ない、得られたアンピシリン耐性コロニーから6株を選び、2mlのLB培地にて37℃、一夜培養した。これらの菌体から抽出したプラスミド約0.5 μ gを2ユニットの制限酵素XhoIにより消化後、1.5%アガロースゲル電気泳動にかけた。この泳動パターンから、HP10085由来cDNAフラグメントが正方向に挿入されているクローンを選出し、pSSD1-HP10085とした(図3)。

10 COS-7細胞のトランスフェクション

形質転換用サンプルは以下のように調製した。pSSD1-HP10085プラスミドを有する大腸菌JM109形質転換株のグリセロールストックから滅菌つまようじで少量を採取し、100 μ g/mlアンピシリン含有2xYT2mlに植菌した。37℃で1時間30分培養後、ヘルパーファージM13K07懸濁液50 μ lを加え、さらに16時間培養した。この培養液について15,000回転、5分間の遠心を2回繰返し、大腸菌体を完全に除去した上清を得た。この上清1.2mlに対して20%ポリエチレングリコール、2.5M NaCl溶液0.3mlを添加し十分に混合し、室温にて10分間静置後、15,000回転、10分間の遠心を行ない、沈澱を回収した。得られた沈澱を120 μ lのトリス-EDTA(pH8.0)に懸濁し、この懸濁液を形質転換に用いた。または培養後の大腸菌体からアルカリリシス法によりプラスミドDNAを抽出し、これをサンプルとした。

サル腎臓由来培養細胞COS7(ATCCより分譲)は、10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル(DMEM)培地中、5%CO₂存在下、37℃で培養した。0.7~0.8x10⁵個のCOS7細胞を6穴プレート(ヌンク社、穴の直径3cm)に植え、5%CO₂存在下、37℃で20~22時間培養した。培地除去後、リン酸緩衝液で細胞表面を洗浄し、さらに50mMトリス塩酸(pH7

- .5)を含むDMEM(TDMEM)で再度洗浄した。この細胞に各サンプル(ファージ懸濁液1~2 μ lもしくは2本鎖DNA 1~2 μ g)を含む0.4mg/ml DEAEデキストラン含有TDMEM 0.8mlを添加し、5%CO₂存在下、37°Cで4時間培養した。サンプル液を除去後、TDMEMで細胞表面を洗浄し、100 μ M
- 5 クロロキン含有TDMEM 1mlを添加し、5%CO₂存在下、37°Cで3時間培養した。この液を除去し、TDMEMにて細胞表面を洗浄後、10%ウシ胎児血清含有DMEMを1穴あたり2ml加え、5%CO₂存在下、37°Cにて5日~1週間培養した。

10 培養上澄のアッセイ

- 2%ウシフィブリノーゲン(マイルス社)、0.5%アガロース、1mM塩化カルシウムを含む50mMリン酸緩衝液(pH7.4)10mlに10単位のヒトトロニンビン(持田製薬)を加え、直径9cmのプレート中で固化させ、フィブリンプレートを調製した。トランスフェクションしたCOS細胞の培養
- 15 上清10 μ lをフィブリンプレートに載せ、37°C、15時間インキュベートした。得られた溶解円の直径をウロキナーゼ活性の指標とした。この結果、ウロキナーゼの全翻訳領域を含む発現ベクターpKA1-UPA[Yokoyama-Kobayashi and Kato, Biochem. Biophys. Res. Commun. 192:935-939 (1993)]を発現させた細胞の培地に溶解円が観察されたが、pS
- 20 SD1およびpSSD1-HP10085を発現させた細胞の培地からは、ウロキナーゼ活性は検出されなかった(図4A)。

細胞表面のウロキナーゼ活性の検出

- 50mMリン酸緩衝液(pH7.4)を用いて、ウシ由来フィブリノーゲンの2
- 25 %溶液および0.5%アガロース溶液を調製し、各液1mlに1M塩化カルシウム2 μ l、トロニンビン2ユニットを加え、直径3.5cmのプレートに流し込み、37°Cにて1時間、重合させた。このプレートから重合したフィ

ブリンを剥がし、薄膜状のフィブリン(フィブリンシート)を得た。

pSSD1-HP10085プラスミドを導入した培養細胞から培地を除去し、リン酸緩衝液を含む生理食塩水により細胞表面を洗浄した。この細胞の表面に密着するようにフィブリンシートをのせ、37℃、一夜インキュベートした。この結果、pSSD1-HP10085およびpKA1-UPAを発現させた細胞表面に溶解斑が観察された(図4B)。

以上の結果から、HP10085のN末端疎水性領域は、分泌シグナル配列としてではなく、膜貫通ドメインとして働いていること、しかもN末端側が細胞質にあり、C末端側が細胞外に出てくるⅡ型膜蛋白質の膜貫通ドメインであることが実験的に証明された。

産業上の利用可能性

本発明により、Ⅱ型膜蛋白質をコードする遺伝子を効率良く同定できるようになる。同定されたⅡ型膜蛋白質をコードする遺伝子は、医薬の開発に有用なⅡ型膜蛋白質の大量生産に用いることができる。

1 1

配列表

配列番号(SEQ ID NO): 1

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH): 697

配列の型(SEQUENCE TYPE): 核酸(Nucleic acid)

5 鎖の数(STRANDNESS): 二本鎖(Double strand)

トポロジー(TOPOLOGY): 直鎖状(Linear)

配列の種類(MOLECULE TYPE): cDNA to mRNA

起源(ORIGINAL SOURCE):

生物名(ORGANISM SPECIES): ホモ=サピエンス(Homo sapiens)

10 細胞の種類(CELL KIND): リンホーマ(Lymphoma)

セルライン(CELL LINE): U937

クローン名(CLONE NAME): HP10085

配列の特徴(SEQUENCE CHARACTERISTICS):

特徴を表す記号(CODE REPRESENTING CHARACTERISTICS): CDS

15 存在位置(EXISTENCE SITE): 151..600

特徴を決定した方法(CARACTERIZATION METHOD): E

配列(SEQUENCE)

TATACCTCTA GTTTGGAGCT GTGCTGTAAA AACAAAGAGTA ACATTTTAT ATTAAAGTTA 60

AATAAGTTA CAACTTTGAA GAGAGTTTCT GCAAGACATG ACACAAAGCT GCTAGCAGAA 120

20 AATCAAAACG CTGATTAAAA GAAGCACGGT ATG ATG ACC AAA CAT AAA AAG TGT 174

Met Met Thr Lys His Lys Lys Cys

1

5

TTT ATA ATT GTT GGT GTT TTA ATA ACA ACT AAT ATT ATT ACT CTG ATA 222

Phe Ile Ile Val Gly Val Leu Ile Thr Thr Asn Ile Ile Thr Leu Ile

25

10

15

20

GTT AAA CTA ACT CGA GAT TCT CAG AGT TTA TGC CCC TAT GAT TGG ATT 270

Val Lys Leu Thr Arg Asp Ser Gln Ser Leu Cys Pro Tyr Asp Trp Ile

1 2

	25	30	35	40	
	GGT TTC CAA AAC AAA TGC TAT TAT TTC TCT AAA GAA GAA GGA GAT TGG				318
	Gly Phe Gln Asn Lys Cys Tyr Tyr Phe Ser Lys Glu Glu Gly Asp Trp				
	45	50	55		
5	AAT TCA AGT AAA TAC AAC TGT TCC ACT CAA CAT GCC GAC CTA ACT ATA				366
	Asn Ser Ser Lys Tyr Asn Cys Ser Thr Gln His Ala Asp Leu Thr Ile				
	60	65	70		
	ATT GAC AAC ATA GAA GAA ATG AAT TTT CTT AGG CGG TAT AAA TGC AGT				414
	Ile Asp Asn Ile Glu Glu Met Asn Phe Leu Arg Arg Tyr Lys Cys Ser				
10	75	80	85		
	TCT GAT CAC TGG ATT GGA CTG AAG ATG GCA AAA AAT CGA ACA GGA CAA				462
	Ser Asp His Trp Ile Gly Leu Lys Met Ala Lys Asn Arg Thr Gly Gln				
	90	95	100		
	TGG GTA GAT GGA GCT ACA TTT ACC AAA TCG TTT GGC ATG AGA GGG AGT				510
15	Trp Val Asp Gly Ala Thr Phe Thr Lys Ser Phe Gly Met Arg Gly Ser				
	105	110	115	120	
	GAA GGA TGT GCC TAC CTC AGC GAT GAT GGT GCA GCA ACA GCT AGA TGT				558
	Glu Gly Cys Ala Tyr Leu Ser Asp Asp Gly Ala Ala Thr Ala Arg Cys				
	125	130	135		
20	TAC ACC GAA AGA AAA TGG ATT TGC AGG AAA AGA ATA CAC TAA				600
	Tyr Thr Glu Arg Lys Trp Ile Cys Arg Lys Arg Ile His				
	140	145			
	GTTAATGTCT AAGATAATGG GGAAAATAGA AAATAACATT ATTAAGTGTA AAACCAGCAA				660
	AGTACTTTTT TAATTAAACA AAGTTCGAGT TTTGTAC				697
25					

請求の範囲

1. 同定すべき蛋白質をコードするDNA断片とリポーター蛋白質を
コードする遺伝子の融合遺伝子を動物細胞に導入して融合蛋白質を発
現させ、リポーター蛋白質が該細胞の膜表面に発現することを指標と
5 する、II型膜蛋白質をコードする遺伝子の同定方法。
2. リポーター蛋白質がプラスミノーゲンアクチベーターである請
求項1記載の方法。

10

15

20

25

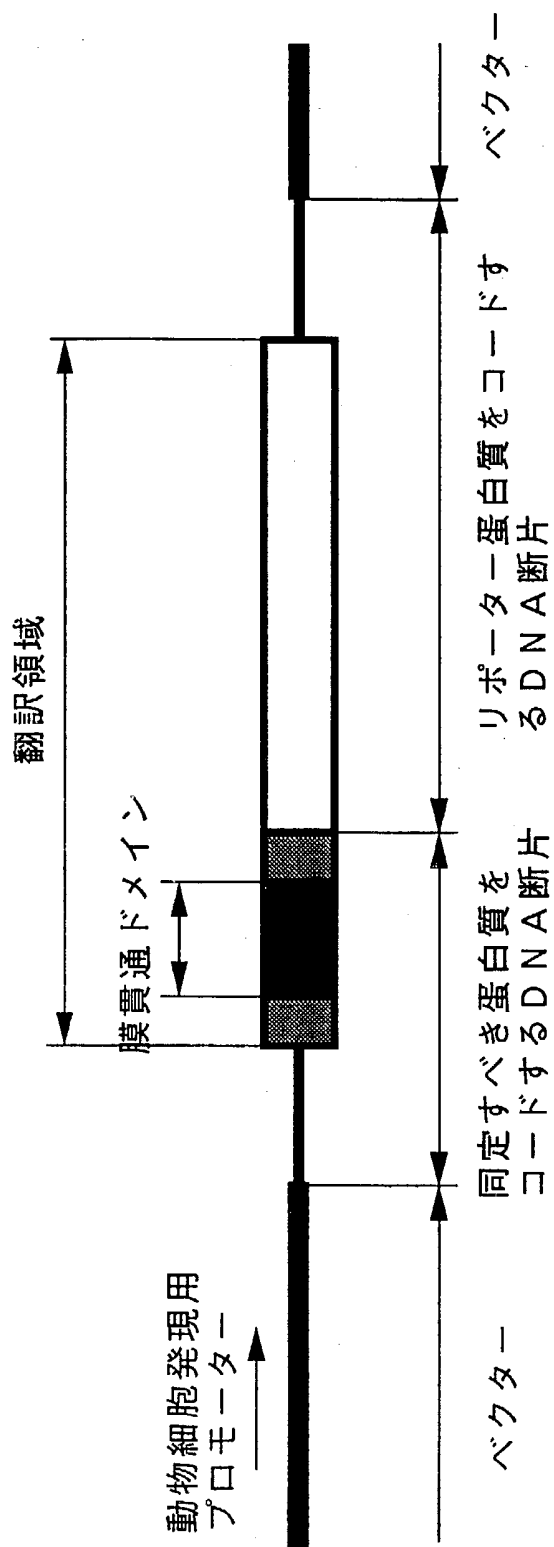


図1

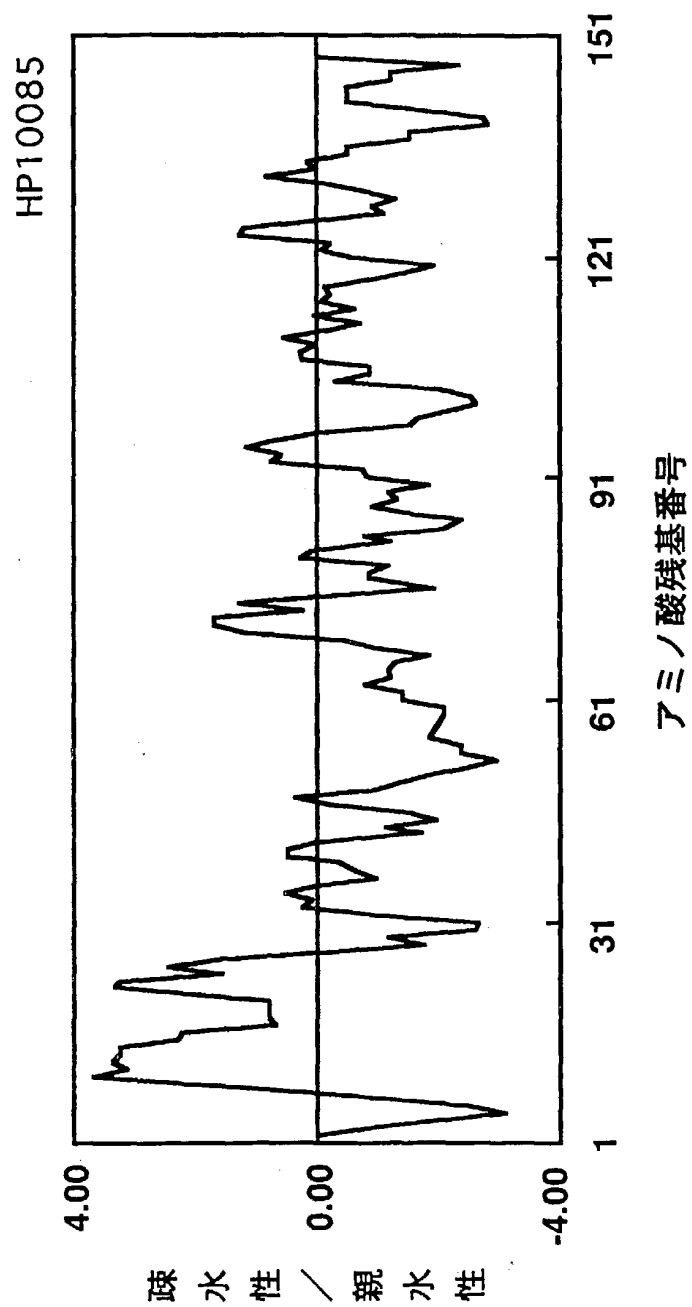


図 2

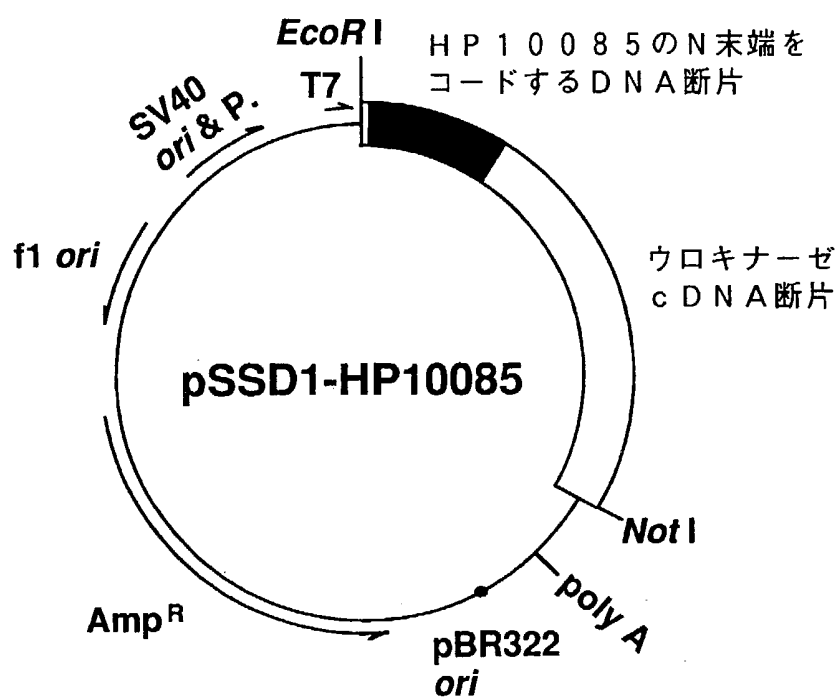
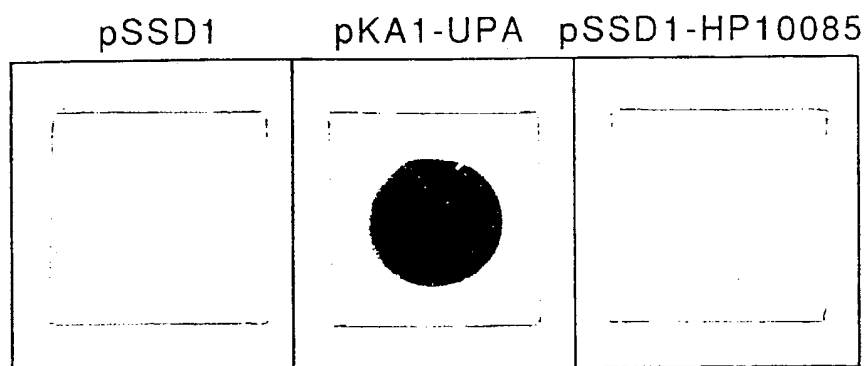


図 3

(A) 培地中のウロキナーゼ活性



(B) 細胞表面のウロキナーゼ活性

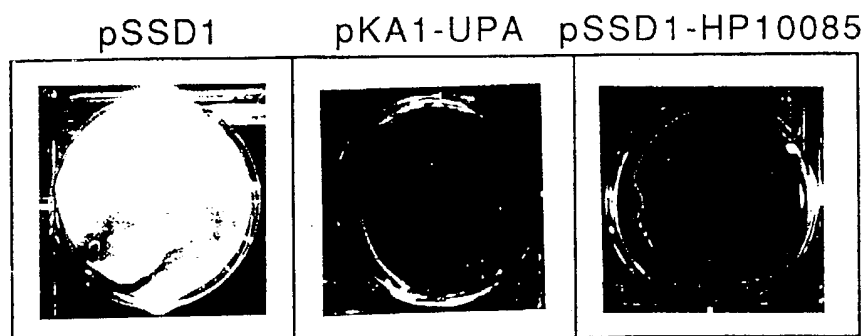


図 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00830

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12Q1/68, C12N15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12Q1/68, C12N15/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Biosis Previews, Medline, Genbank

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 89, (1992), Aoki D. et al., "Golgi retention of a trans-Golgi membrane protein, galactosyltransferase, requires cysteine and histidine residues within the membrane-anchoring domain" p.4319-4323	1, 2
Y	J. Biol. Chem., Vol. 267, (1992), Tang B.L. et al., "The Transmembrane Domain of N-Glucosaminyl-transferase I Contains a Golgi Retention Signal" p.10122-10126	1, 2
Y	Science, Vol. 261, (1993), Tashiro K. et al., "Signal Sequence trap: A Cloning Strategy for Secreted Proteins and Type I Membrane Proteins" p.600-603	1, 2
Y	Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 93, (1996), Klein R. et al., "Selection for genes encoding secreted proteins and receptors" p.7108-7113	1, 2

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
March 25, 1998 (25. 03. 98)Date of mailing of the international search report
April 7, 1998 (07. 04. 98)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00830

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Gene, Vol. 198, (1997), Jacob K. A. et al., "A genetic selection for isolating cDNAs encoding secreted proteins" p.289-296	1, 2
P, A	Immunogenetics, Vol. 45, (1997), Hamann J. et al., "AICL: a new activation-induced antigen encoded by the human NK gene complex" p.295-300	1, 2

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/00830

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl^o C12Q1/68, C12N15/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl^o C12Q1/68, C12N15/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Biosis Previews, Medline, Genbank

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 第89巻, (1992), Aoki D. et al「Golgi retention of a trans-Golgi membrane protein, galactosyltransferase, requires cysteine and histidine residues within the membrane-anchoring domain」p. 4319-4323	1, 2
Y	J. Biol. Chem., 第267巻, (1992), Tang B. L. et al「The Transmembrane Domain of N-Glucosaminyltransferase I Contains a Golgi Retention Signal」p. 10122-10126	1, 2
Y	Science, 第261巻, (1993), Tashiro K. et al「Signal Sequence trap: A Cloning Strategy for Secreted Proteins and Type I Membrane Proteins」p. 600-603	1, 2

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 03. 98

国際調査報告の発送日

07.04.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

平 田 和 男

4 B

7 8 2 3

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 第93巻, (1996), Klein R. et al 「Selection for genes encoding secreted proteins and receptors」p. 7108-7113	1, 2
P, X	Gene, 第198巻, (1997), Jacob K. A. et al「A genetic selection for isolating cDNAs encoding secreted proteins」p. 289-296	1, 2
P, A	Immunogenetics, 第45巻, (1997), Hamann J. et al「AICL: a new activation-induced antigen encoded by the human NK gene complex」p. 295-300	1, 2